



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0117033
(43) 공개일자 2016년10월10일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/30 (2006.01) A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 47/30 (2013.01)
A61K 31/4184 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0045612</p> <p>(22) 출원일자 2015년03월31일
심사청구일자 2015년03월31일</p> | <p>(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
박정숙
대전광역시 유성구 노은서로 210번길 32, 405동 405호
강봉석
경기도 안산시 상록구 충장로 193, 205동 807호</p> <p>(74) 대리인
특허법인 공간</p> |
|--|---|

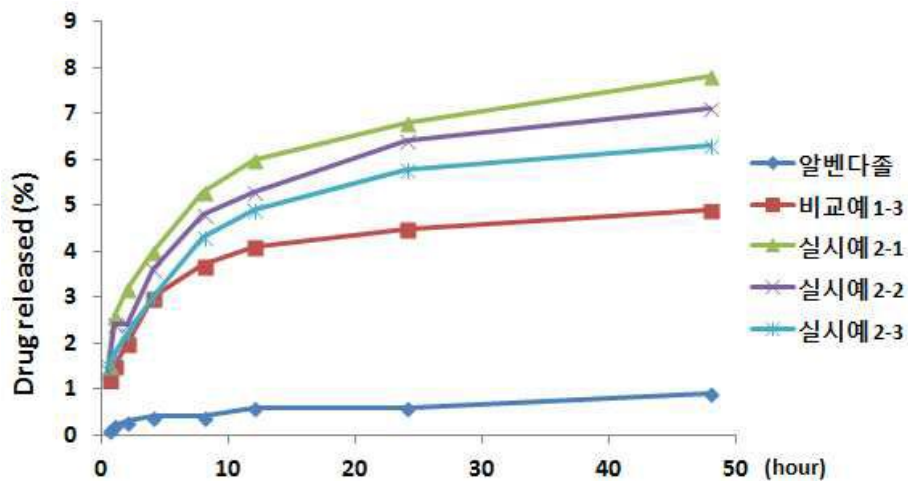
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 신규한 알벤다졸 나노입자 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신규한 알벤다졸 나노입자 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 알벤다졸 나노입자의 제조를 통해 난용성 알벤다졸을 가용화하여, 생체이용률이 현저하게 개선될 수 있으며, 상기 알벤다졸 나노입자의 제조를 통해 알벤다졸을 암의 예방 또는 치료용 조성물로서 용이하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61K 47/36 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0006681

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 심혈관계 질환 치료제 개발 기반 연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

PLGA(poly-dl-lactic-co-glycolic acid)에 폴록사머 188(poloxamer 188)과 알벤다졸(albendazole)을 가하여 제조한 나노입자를 키토산(chitosan)으로 코팅한 것을 특징으로 하는 알벤다졸 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 PLGA 100 중량부 기준으로, 폴록사머 188을 50~300 중량부로 가하는 것을 특징으로 하는 알벤다졸 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 PLGA 100 중량부 기준으로, 알벤다졸 10~50 중량부를 가하는 것을 특징으로 하는 알벤다졸 나노입자.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 PLGA 100 중량부 기준으로, 키토산 50~200 중량부를 가하는 것을 특징으로 하는 알벤다졸 나노입자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항의 알벤다졸 나노입자를 함유하는 암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가하여 약제학적 투여형으로 제형화되는 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

(1공정) PLGA와 폴록사머 188을 아세톤에 녹이고, 알벤다졸을 가하여 초음파 처리를 하는 단계;

(2공정) 상기 1공정의 초음파 처리된 알벤다졸 용액에 에탄올을 가하고 교반한 후, 증류수를 첨가하고 다시 교반한 뒤에 용매를 제거하여 나노입자를 제조하는 단계; 및,

(3공정) 상기 2공정의 나노입자에 물을 첨가하여 나노입자 현탁액을 제조한 후, 초산용액에 녹인 키토산 용액을 첨가하고 초음파 처리하여 키토산을 코팅하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 알벤다졸 나노입자의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 알벤다졸 나노입자 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생물약제학분류체계(the Biopharmaceutics Classification System, BCS)는 학계, 산업계 및 규제 분야에서 널리

리 사용되고 있다(Amidon et al., Pharm. Res., 12, pp413-420, 1995). BCS는 물에 대한 용해도와 장관 투과도를 기준으로 약물을 분류하는 체계이다(Evrard et al., J. Control. Release, 85, pp45-50, 2002). BCS는 4개의 단계로 구분되는데, 클래스 1은 용해도와 투과도가 모두 높고, 클래스 2는 용해도는 낮으나 투과도가 좋으며, 클래스 3은 용해도는 높으나 투과도가 낮으며, 클래스 4는 용해도와 투과도 모두 낮다(Wu and Benet, Pharm. Res., 22, pp11-23, 2005).

[0003] 알벤다졸은 BCS II에 해당하며, 물에 대한 용해도가 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 매우 낮고 투과도는 좋은 약물이다(Jung et al., J. Pharm. Pharmacol., 50, pp43-48, 1998). 알벤다졸은 벤즈이미다졸계 광범위 구충제로 사람과 동물에 모두 사용된다(Pourgholami et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 397, pp729-734, 2010). 알벤다졸은 또한 간암세포주의 *in vitro* 및 *in vivo* 증식을 강하게 억제하는 것으로 알려져 있다(Pourgholami et al., Cancer Lett., 165, pp43-49, 2001).

[0004] 약물의 용해도를 개선하기 위해 마이크로입자와 나노입자가 사용되고 있다. 미국 FDA에서 약물 수송체에 사용하도록 허가된 PLGA(poly-dl-lactic-co-glycolic acid)는 생분해성 고분자로 수십년간 제어방출을 목적으로 사용되어 왔다(Kang et al., Int. J. Pharm., 286, 147-156, 2004).

[0005] 키토산은 생분해성 다당류로, 무독성 고분자이고, 점막점착성과 투과향상능력을 갖고 있을 뿐만 아니라 조직적합성을 갖고 있기 때문에, 약물의 점막 수송에 적용하기 매우 적합하다(Mao et al., J. Control. Release, 70, pp399-421, 2001; Borchard et al., J. Control. Release, 39, pp131-138, 1996; Felt et al., Drug Dev. Ind. Pharm., 24, pp979-993, 1998). 또한 키토산은 경구용 나노입자를 이용한 약물 수송체 제조에도 사용할 수 있다(Morishita and Peppas, Drug Descov. Today, 11, pp905-910, 2006; Wilson et al., Nanomedicine, 6, pp144-152, 2009).

[0006] 폴록사머(poloxamer188, P188)는 다양한 응용분야에서 널리 사용되는 계면활성제로, 물과 유기용매에 모두 용해 가능하다. 폴록사머와 폴록사민의 비이온성 계면활성제는 여러 생체의료분야에서 응용되고 있으며, 그 범위는 약물 수송체로부터 의료용 이미징에 이르기까지 다양하다(Moghimi and Hunter, Trends Biotechnol., 18, pp412-420, 2000).

[0007] 한편, 본 발명자들은 알벤다졸의 가용화 방법에 관해 연구하던 중, PLGA(poly-dl-lactic-co-glycolic acid)에 폴록사머를 혼합한 것에 알벤다졸을 가하고 이를 키토산으로 코팅한 나노입자의 제조를 통해, 알벤다졸의 용해성이 현저하게 증가되고, 상기 나노입자를 포함하는 조성물이 항암 효과가 매우 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.

[0008] 선행기술 미국공개특허 제2013-0189368호에는 유선염 치료가 가능한 항생제를 함유하는 나노입자 제조기술이 개시되어 있고, 상기 항생제로서 알벤다졸이 사용될 수 있음이 개시되어 있기는 하지만, 본 발명의 방법으로 알벤다졸의 가용화성 및 약물 이용성을 현저하게 높인 나노입자를 제조할 수 있음은 상기 미국공개특허 제2013-0189368호에 개시되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 미국공개특허 제2013-0189368호 (NANOPARTICULATE COMPOSITION CONTAINING ANTIBIOTICS FOR INTRAMAMMARY ADMINISTRATION IN ANIMALS, 2013.07.25. 공개)

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, J.R. Crison, A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability, Pharm Res 12, 413-420, 1995-Backstory of BCS The AAPS Journal, 16(5) (2014) 894-898.

(비특허문헌 0002) B. Evrard, P. Chiap, P.D. Tullio, F. Ghalmi, G. Piel. Y.V. Hees, J. Crommen, B. Losson, L. Delattre, Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from a solution containing hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Journal of Controlled Release, 85 (2002) 45-50.

(비특허문헌 0003) C.Y. Wu, L.Z. Benet, Predicting Drug Disposition via Application of BCS:

Transport/Absorption/Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System, *Pharmaceutical Research*, 22(1) (2005) 11-23.

(비특허문헌 0004) H. Jung, L. Medina, L. Garcia, I. Fuentes, R.M. Esparza, Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolite albendazole sulphoxide, *J. Pharm.Pharmacol*, 50 (1998) 43-48.

(비특허문헌 0005) M.H. Pourgholami, L.M. Khachigian, R.G. Fahmy, S. Badar, L. Wang, S.W.L. Chu, D.L. Morris, Albendazole inhibits endothelial cell migration, tube formation, vasopermeability, VEGF receptor-2 expression and suppresses retinal neovascularization in ROP model of angiogenesis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397 (2010) 729-734.

(비특허문헌 0006) M.H. Pourgholami, L. Woon, R. Almajd, J. Akhter, P. Bowery, D.L. Morris, In vitro and in vivo suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole, *Cancer Letters*, 165 (2001) 43-49.

(비특허문헌 0007) B.K. Kang, S.K Chon, S.H. Kim, S.Y. Jeong, M.S. Kim, S.H. Cho, H.B. Lee, G. Khang, Controlled release of paclitaxel from microemulsion containing PLGA and evaluation of anti-tumor activity in vitro and in vivo, *International Journal of Pharmaceutics*, 286 (2004) 147-156.

(비특허문헌 0008) H.Q. Mao, K. Roy, V.L. Troung-Le, K.A. Janes, K.Y. Lin, Y. Wang, J.T. August, K.W. Leong, Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency, *Journal of Controlled Release* 70 (2001) 399-421.

(비특허문헌 0009) G. Borchard, H.L. Lueßen, A.G. de Boer, J.C. Verhoef, C.M. Lehr, H.E. Junginger, The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption. III: effects of chitosan glutamate and carbomer on epithelial tight junctions in vitro, *J. Control. Release*, 39 (1996) 131-138.

(비특허문헌 0010) O. Felt, P. Buri, R. Gurny, Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery, *Drug Dev. Ind. Pharm*, 24 (1998) 979-993.

(비특허문헌 0011) M. Morishita, N.A. Peppas, Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery, *Drug Discovery Today*, 11 (2006) 905-910.

(비특허문헌 0012) B. Wilson, M.K. Samanta, K. Santhi, K.P. Kumar, M. Ramasamy, B. Suresh, Chitosan nanoparticles as a new delivery system for anti-Alzheimer's drug tacrine, *Nanomedicine*, 6 (2009) 144-152.

(비특허문헌 0013) S.M. Moghimi, A.C. Hunter, Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine, *Trends Biotechnol*, 18 (2000) 412-420.

(비특허문헌 0014) H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, *Polymers*, 3 (2011) 1377-1397.

(비특허문헌 0015) M. Malhotra, D.K. Majumdar, Permeation through cornea, *Indian Journal of Experimental Biology*, 39 (2001) 11-24.

(비특허문헌 0016) S.G. Castro, S.F. Sanchez Bruni, L.P. Urbizu, A. Confalonieri, L. Ceballos, C.E. Lanusse, D.A. Allemanni, S.D. Palma, Enhanced dissolution and systemic availability of albendazole formulated as solid dispersions, *Pharmaceutical Development and Technology*, 18(2) (2013) 434-442.

(비특허문헌 0017) A. Yang, L. Yang, W. Liu, Z. Li, H. Xu, X. Yang, Tumor necrosis factor alpha blocking peptide loaded PEG-PLGA nanoparticles: preparation and in vitro evaluation, *International Journal of Pharmaceutics*, 331 (2007) 123-132.

(비특허문헌 0018) K.M. Gregorio-Jauregui, M.G. Pineda, J.E. Rivera-Salinas, G. Hurtado, H. Saade, J.L. Martinez, A. Ilyina, R.G. L'opez, One-Step Method for Preparation of Magnetic Nanoparticles Coated with Chitosan, *Journal of Nanomaterials*, 2012(2012) 1-8.

(비특허문헌 0019) A. Sharma, C.P. Jain, Y.S. Tanwar, Preparation and Characterization of Solid Dispersions of Carvedilol with Poloxamer 188, Journal of the Chilean Chemical Society, N° 1 (2013) 53.

(비특허문헌 0020) K. Daniel-Mwambete, S. Torrado, C. Cuesta-Bandera, F. Ponce-Gordo, J.J. Torrado, The effect of solubilization on the oral bioavailability of three benzimidazole carbamate drugs, International Journal of Pharmaceutics 272 (2004) 29-36.

(비특허문헌 0021) K. Okano, T. Minagawa, J. Yang, M. Shimojoh, K. Kurita, Amorphous reprecipitated chitosan as a novel morphological form, Polymer Bulletin, 62 (2009) 119-126.

(비특허문헌 0022) H. Takeuchi, J. Thongborisute, Y. Matsui, H. Sugihara, H. Yamamoto, Y. Kawashima, Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems, Advanced Drug Delivery Reviews 57 (2005) 1583-1594.

(비특허문헌 0023) Y. Liu, X.Q. Wang, W.X. Ren, Y.L. Chen, Y. Yu, J.K. Zhang, D. Bawudong, J.P. Gu, X.D. Xu, X.N. Zhang, Novel albendazole-chitosan nanoparticles for intestinal absorption enhancement and hepatic targeting improvement in rats. J Biomed Mater Res B Appl Biomater (2013) 101(6), 998-1005.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 신규한 알벤다졸 나노입자 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 PLGA(poly-dl-lactic-co-glycolic acid)에 폴록사머 188(poloxamer 188)과 알벤다졸(albendazole)을 가하여 제조한 나노입자를 키토산(chitosan)으로 코팅한 것을 특징으로 하는 알벤다졸 나노입자에 관한 것이다.
- [0013] 상기 알벤다졸 나노입자의 제조를 위해, PLGA 100 중량부 기준으로 폴록사머 188을 50~300 중량부로 가하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 PLGA 100 중량부 기준으로, 알벤다졸 10~50 중량부를 가할 수 있으며, 키토산은 50~200 중량부를 가할 수 있다.
- [0014] 본 발명은 상기 알벤다졸 나노입자를 함유하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 약 제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가하여 약제학적 투여형으로 제형화될 수 있다.
- [0015] 본 발명은 또한, (1공정) PLGA와 폴록사머 188을 아세톤에 녹이고, 알벤다졸을 가하여 초음파 처리를 하는 단계;
- [0016] (2공정) 상기 1공정의 초음파 처리된 알벤다졸 용액에 에탄올을 가하고 교반한 후, 증류수를 첨가하고 다시 교반한 뒤에 용매를 제거하여 나노입자를 제조하는 단계; 및,
- [0017] (3공정) 상기 2공정의 나노입자에 물을 첨가하여 나노입자 현탁액을 제조한 후, 초산용액에 녹인 키토산 용액을 첨가하고 초음파 처리하여 키토산을 코팅하는 단계;
- [0018] 를 포함하는 알벤다졸 나노입자를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0019] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0020] 본 발명은 PLGA에 폴록사머 188과 알벤다졸을 가하여 제조한 나노입자를 키토산으로 코팅한 것을 특징으로 하는 알벤다졸 나노입자에 관한 것이다.
- [0021] 상기 PLGA(폴리-D,L-락트산-코-글리콜산)는 분자량이 13,000~54,000인 것을 사용하는 것이 좋다. 바람직하게는 상기 PLGA는 분자량 33,000~54,000인 것을 사용하는 것이 좋으며, 가장 바람직하게는 분자량 38,000~54,000인 것을 사용하는 것이 좋다. 또한 상기 PLGA로 폴리-D,L-락트산-코-글리콜산(50:50)을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0022] 본 발명은 또한, 알벤다졸 나노입자를 제조하는 방법을 제공하는데,

- [0023] 1공정의 PLGA와 폴록사머 188을 아세톤에 녹이고, 알벤다졸을 가하여 초음파 처리를 하는 단계에서는 PLGA와 폴록사머 188을 1:0.5~3의 중량비(PLGA 100 중량부 기준으로, 폴록사머 188은 50~300 중량부)로 혼합한 것의 총 중량 기준으로, 100~300 부피배의 아세톤을 가할 수 있다. 상기 아세톤 대신 에탄올, 디클로로메탄, 클로로포름 등을 이용할 수도 있지만, 아세톤을 사용하는 것이 가장 바람직하며, 이 때의 알벤다졸의 용해도가 가장 좋다. 알벤다졸을 PLGA와 폴록사머 188의 아세톤 용액에 가할 때, 알벤다졸은 PLGA의 0.1~0.5배(PLGA 100 중량부 기준으로 10~50 중량부)의 중량으로 가할 수 있다.
- [0024] 2공정의 알벤다졸 용액에 에탄올을 가하고 교반한 뒤, 증류수를 첨가하고 다시 교반하여 나노입자를 제조하는 단계에서, 에탄올은 1공정의 아세톤 부피의 1~10배를 가하는 것이 바람직하며, 증류수는 아세톤 부피의 5~20배를 가하는 것이 좋다.
- [0025] 3공정의 나노입자에 초산용액에 녹인 키토산 용액을 첨가하고 초음파 처리하여 키토산을 코팅하는 단계에서, 키토산의 용매로 사용되는 초산용액의 농도는 0.05~0.5M인 것이 좋다. 키토산은 상기 초산 용액에 0.5~2mg/ml의 농도로 가하는 것이 바람직하다.
- [0026] 상기 1~3공정의 각 나노입자 구성성분의 농도 또는 용매 부피의 적절한 비를 벗어나게 되면 알벤다졸 나노입자의 형성이 잘 되지 않거나, 안정성이 낮아 장기간 보관하기가 어렵다.
- [0027] 상기 1공정 또는 3공정의 초음파 처리는 30~50kHz의 음파로 수행하는 것이 바람직하다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 알벤다졸 나노입자를 함유하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 알벤다졸 나노입자는 본 발명의 약학 조성물에 0.001~90 중량%, 바람직하게는 1~60 중량%, 더 바람직하게는 1~30 중량%로 하여 첨가될 수 있다.
- [0029] 상기 암은 일반적인 암 질환을 포함하며, 바람직하게는, 대장암, 폐암, 자궁경부암, 뇌하수체선종, 뇌종양, 위암, 간암, 유방암, 췌장암, 자궁암, 백혈병, 식도암, 전립선암, 방광암 및 난소암에서 선택된 질환이며, 보다 바람직하게는, 대장암일 수 있다.
- [0030] 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 추출물 또는 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

발명의 효과

[0033] 본 발명은 신규한 알벤다졸 나노입자 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 알벤다졸 나노입자의 제조를 통해 난용성 알벤다졸을 가용화하여, 생체이용률이 현저하게 개선될 수 있으며, 상기 알벤다졸 나노입자의 제조를 통해 알벤다졸을 암의 예방 또는 치료용 조성물로서 용이하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 유기용매에서의 알벤다졸 약물 자체의 용해도를 나타내는 그래프이다.

도 2는 각 알벤다졸 나노입자의 제타전위를 나타내는 그래프이다.

도 3A(도 3A-1 및 도 3A-2)는 알벤다졸 약물 자체의 각 배율별 주사전자현미경 이미지를 나타내며, 도 3B(도 3B-1 및 도 3B-2)는 실시예 2-3의 알벤다졸 나노입자의 각 배율별 주사전자현미경 이미지를 나타낸다.

도 4는 알벤다졸, PLGA, 폴록사머 188, 키토산, 이들의 혼합물, 비교예 1-3의 알벤다졸 나노입자, 실시예 2-1 내지 2-3의 알벤다졸 나노입자의 FT-IR 스펙트럼 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 알벤다졸, PLGA, 폴록사머 188, 키토산, 비교예 1-3의 알벤다졸 나노입자 및 실시예 2-1의 알벤다졸 나노입자의 시차주사열량변화를 나타내는 그래프이다.

도 6은 알벤다졸, PLGA, 키토산, 비교예 1-3의 알벤다졸 나노입자 및 실시예 2-3의 알벤다졸 나노입자의 X선 회절 패턴을 나타내는 그래프이다.

도 7은 pH 7.4에서 비교예 1-1 내지 1-6 나노입자의 알벤다졸 시험관내 방출을 나타내는 그래프이다.

도 8은 pH 7.4에서 알벤다졸, 비교예 1-3 및 실시예 2-1 내지 2-3의 나노입자의 알벤다졸 시험관내 방출을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0036] <실시예 1. 알벤다졸의 용해도 측정>

[0037] 알벤다졸을 유기용매(아세톤, 에탄올, 디클로로메탄, 클로로포름)에 넣어 녹이고 1시간 동안 초음파 처리하였다(40kHz). 용액을 주사기용 필터로 여과한 후, 농도를 측정하여 약물의 용해도를 측정하였다. 알벤다졸은 용해도가 낮으나 투과도가 좋은 BSC II 약물로서(Wu and Benet, Pharm. Res., 22, pp11-23, 2005), 통상적으로 유기용매에 녹여서 사용한다. 유기용매로는 에탄올, 아세톤, 디클로로메탄 및 클로로포름을 사용하였고, 알벤다졸을 1mg/ml의 농도로 가하였고, 이에 대한 용해도 값은 표 1에 나타내었다. 용해도 측정을 위해서는, 각 유기용매에 알벤다졸을 1mg/ml로 가한 후 1시간 동안 27℃의 조건에서 초음파 처리(40kHz)를 한 후 각 유기용매에 녹인 알벤다졸의 농도 측정을 위해 각 용매를 0.45 μm필터를 이용하여 여과하고, 여과된 액상을 이동상에 100배 희석하여 PeakmanSP사의 HPLC(SP⁺LC model)를 사용하여 분석하였다. HPLC system은 두 개의 SP 3101 pump, SP 3002 UV/Vis detect, SP 3004 column oven, SP 3010 switching valve, SP 3023 autosampler로 구성되었으며, 알벤다졸의 분리에는 Shiseido사(Japan)의 Capcell Pak C18 column (150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm particle size)을 사용하였고 column의 온도는 30℃를 유지하였다. 이동상은 아세토니트릴(acetonitrile):메탄올(methanol):아세트이트 완충액(acetate buffer) (pH 4.5)을 30:15:55 (v/v/v)의 비율로 혼합하여 사용하였으며, 시료 25 μl를 주입하고 유속은 1 ml/min으로, 파장 295 nm에서 검출하였다.

[0038] 도 1을 참고하면, 각 유기용매에 대한 알벤다졸의 용해도는 아세톤(acetone)을 사용했을 때 911.9±79.1μg으로 가장 높다. 에탄올(EtOH)에 대한 알벤다졸의 용해도는 797.8±36.8μg, 디클로로메탄(DCM)에 대한 알벤다졸의 용해도는 667.5±210.7μg, 클로로포름(chloroform)에 대한 알벤다졸의 용해도는 795.3±72.6μg이다. PLGA 나노입자를 제조할 때, 약물에 대한 용매로는 아세톤, 클로로포름, 디클로로메탄이 주로 사용되는데(Makadia and Siegel, Polymers, 3, pp1377-1397, 2011), 에탄올은 독성이 적을 뿐만 아니라 많은 약물을 녹이는데 사용되지만, PLGA가 에탄올에 잘 녹지 않으므로 바람직하지 않을 것이라 판단하여 PLGA 나노입자 제조에는 적합하지 않을 것으로 고려하였다. 디클로로메탄은 휘발되어 용해도에서 큰 편차를 나타내었기 때문에 역시 적절하지 않다

고 판단하였다. 따라서 PLGA가 포함된 난용성의 알벤다졸 나노입자를 제조할 용매로서 아세톤을 선택하였다.

<실시예 2. 비교대상 알벤다졸 나노입자의 제조>

본 발명의 알벤다졸 나노입자는 수정된 용매확산법을 이용하여 제조하였다. PLGA(poly-dl-lactic-co-glycolic acid)(Resomer[®], RG504H, 분자량 38,000~54,000)에 폴록사머 188(poloxamer 188)을 가하여 나노입자를 제조하였는데, 이 때 사용된 각 구성성분의 중량은 하기 표 1의 조건으로 하였다.

표 1

조건	PLGA (mg)	폴록사머 188 (mg)	키토산 (mg)	알벤다졸 (mg)
실시예 2-1	10	20	5	2
실시예 2-2	10	20	10	2
실시예 2-3	10	20	20	2
실시예 2-4	10	5	10	2
실시예 2-5	10	30	10	2
실시예 2-6	10	20	10	1
실시예 2-7	10	20	10	5

먼저, PLGA와 폴록사머 188을 2ml 아세톤에 녹이고, 알벤다졸을 가하여 5분간 초음파 처리를 하였다(40kHz). 이 용액을 10ml 에탄올에 붓고 20분간 교반한 후, 다시 25ml 증류수에 부어 15분간 450rpm으로 교반하였다. 65℃에서 25분간 450rpm으로 교반하면서 용매를 증발시켰다.

나노입자의 키토산 코팅을 위해서 키토산 5, 10, 20mg을 0.2M 초산용액에 녹여 각각 0.5, 1, 2mg/ml의 키토산 용액을 제조하였다.

이 후, 상기 용매가 증발된 나노입자 조성물에 물을 추가하여 10ml의 나노입자 현탁액 상태로 제조한 후, 상기 나노입자의 현탁액 10ml를 키토산 용액에 가한 후 20분간 초음파 처리하였다(40kHz). 최종적으로, 유기용매를 증발시키고, 세척 후 동결건조하였다.

<비교예 1. 비교대상 알벤다졸 나노입자의 제조>

하기 표 2의 조건으로 실시예 2와 같이 나노입자를 제조하되, 키토산을 코팅하지 않은 군들은 용매 증발과정 이후, 12000rpm에서 20분간 원심분리하여 나노입자를 정제하였다.

표 2

조건	PLGA (mg)	폴록사머 188 (mg)	폴록사머 407 (mg)	키토산 (mg)	알벤다졸 (mg)
비교예 1-1	10	5	-	-	2
비교예 1-2	10	10	-	-	2
비교예 1-3	10	20	-	-	2
비교예 1-4	10	-	5	-	2
비교예 1-5	10	-	10	-	2
비교예 1-6	10	-	20	-	2
비교예 1-7	10	3	-	10	2
비교예 1-8	10	40	-	10	2
비교예 1-9	10	20	-	10	10
비교예 1-10	10	20	-	40	2
비교예 1-11	10	20	-	5	-
비교예 1-12	10	20	-	10	-
비교예 1-13	10	20	-	20	-
비교예 1-14	10	-	5	10	2
비교예 1-15	10	-	10	10	2
비교예 1-16	10	-	20	10	2
비교예 1-17	30	20	-	10	2

[0048] 한편, 비교예 1-9은 난용성 알벤다졸의 함량이 너무 높아 용매에 잘 용해되지 않음으로써 나노입자의 형성이 불가능하였으며, 비교예 1-10의 경우에도 키토산의 함량이 너무 높아 겔화가 진행되어 흐름성이 좋지 않아 나노입자의 형성이 되지 않았기에, 상기 비교예 1-9 및 1-10은 모두 나노입자를 제조하기에 적합하지 않은 조건인 것으로 확인된다.

[0049] <실험예 1. 알벤다졸 나노입자의 크기, 분산도, 봉입효율 및 제타전위 확인>

[0050] 제조 직후의 나노입자를 증류수에 희석하고 25℃에서 5분간 초음파 처리하여(40kHz) 균질하게 한 후, 나노입자의 크기와 분산도(Polydispersity index, PDI)를 nano-S90(Malvern Co. UK) 장치를 이용하여 측정하였다. 봉입효율을 확인하기 위해서는 상층액을 제거하고 나노입자를 취합하기 위해, 나노입자를 4℃, 12000rpm에서 20분간 원심분리하였다. 키토산이 코팅된 나노입자는 초산에 녹인 후 아세트니트릴에 희석하였고, 코팅하지 않은 나노입자는 바로 아세트니트릴에 용해하였다. 각 시료를 원심분리한 후, 상층액을 취하여 나노입자에 봉입된 알벤다졸의 양을 측정하였다. 나노입자의 제타전위도 나노입자를 증류수에 희석하여 측정하였다(분석장비:ELS-Z, Otsuka, Japan). 상기 각 측정값들은 하기 표 3 및 도 2에 나타내었다(나노입자가 형성되지 않은 비교예 1-9, 1-10은 결과값을 얻을 수 없어 기재하지 않았으며, 알벤다졸을 포함하지 않은 나노입자인 비교예 1-11 내지 13의 값은 나타내지 않음).

[0051] 이 때, 봉입효율은 제조된 나노입자에 약물이 어느 정도 들어가 있는지 확인한 값으로서, (봉입효율[%] = 제조된 나노입자에 포함된 알벤다졸 양 / 총 첨가된 알벤다졸 양 × 100)으로 계산하여, 약물이 입자에 얼마나 효율적으로 포집되었는지 확인한다. 수율은 (수율 = (전체 들어간 고분자 및 계면활성제 약물의 중량 - 최종적으로 만들어진 나노 입자의 중량) / 전체 들어간 고분자 및 계면활성제 약물의 중량)을 측정하여 어느 정도의 손실이 나타났는지를 측정함으로써 생산성이 좋고 나쁨을 나타낸 값을 말한다.

표 3

나노입자	봉입효율 (%)	입자크기 (nm)	분산도	수율 (%)
실시예 2-1	44.8 ± 3.8	260.6 ± 21.2	0.18	65.51 ± 3.8
실시예 2-2	43.4 ± 1.8	336.5 ± 26.5	0.18	63.25 ± 7.5
실시예 2-3	54.6 ± 4.1	480.5 ± 32.6	0.14	67.84 ± 6.4
실시예 2-4	46.8 ± 5.6	378.7 ± 25.5	0.16	69.74 ± 4.5
실시예 2-5	49.5 ± 3.3	486.6 ± 12.6	0.13	58.34 ± 3.7
실시예 2-6	53.6 ± 6.4	255.9 ± 25.7	0.14	66.74 ± 4.8
실시예 2-7	51.7 ± 3.5	468.9 ± 26.4	0.16	59.64 ± 6.0
비교예 1-1	24.1 ± 2.6	185.0 ± 63.2	0.11	45.97 ± 3.7
비교예 1-2	33.8 ± 2.7	153.4 ± 6.5	0.11	47.88 ± 4.8
비교예 1-3	35.8 ± 3.8	164.5 ± 10.9	0.20	47.58 ± 9.5
비교예 1-4	14.5 ± 2.8	156.5 ± 2.4	0.11	34.64 ± 6.3
비교예 1-5	12.3 ± 1.4	211.0 ± 51.8	0.16	32.77 ± 4.2
비교예 1-6	12.8 ± 3.3	195.1 ± 9.3	0.22	36.48 ± 5.3
비교예 1-7	26.6 ± 2.7	148.8 ± 63.9	0.38	28.80 ± 4.8
비교예 1-8	30.5 ± 3.9	467.6 ± 44.6	0.66	36.77 ± 3.6
비교예 1-14	19.6 ± 2.6	276.5 ± 34.0	0.54	39.66 ± 1.9
비교예 1-15	18.7 ± 3.5	358.4 ± 86.7	0.45	36.77 ± 2.6
비교예 1-16	19.8 ± 1.0	366.6 ± 95.8	0.56	35.88 ± 5.7
비교예 1-17	21.0 ± 4.3	476.8 ± 104.9	0.67	46.58 ± 4.8

[0053] 상기 표 3을 참고하면, 실시예 2의 알벤다졸 나노입자의 크기는 250~500 nm이며, 입자크기의 균일도를 나타내는 분산도(polydispersity index, PDI)가 0.14~0.18로 고른 크기를 갖는 나노입자가 제조되었음을 알 수 있다.

[0054] 비교예 1의 알벤다졸 나노입자의 크기는 150~500nm의 다양한 범위에서 제조되었고, 분산도도 0.10~0.80으로 제조되었는데, PDI의 분포가 커 크기가 균일하지 않은 나노입자가 제조되었음을 알 수 있다. 나노입자의 크기가 균일할 경우, 장기간 보관에도 안정적이고, 체내 투여할 경우, 약물이 일정한 농도를 유지하며 안정적으로 방출될 수 있다.

[0055] 또한, 실시예 2의 나노입자가 봉입효율과 수율이 전체적으로 가장 높아 약물 제조 공정에서의 효율이 가장 좋은

것으로 확인된다. 게다가, 키토산 코팅을 했음에도 불구하고 폴록사머 188 대신 폴록사머 407을 사용한 알벤다졸 나노입자(비교예 1-14 내지 16)의 크기나 분산도, 봉입효율, 수율이 현저하게 차이가 나는 것을 통해, 알벤다졸 나노입자의 제조시, 폴록사머의 종류에 따른 효과 차이가 매우 큼을 알 수 있다.

[0056] 제타전위의 경우, 도 2를 참고하면, 알벤다졸 약물 자체와 비교예 1-3의 알벤다졸 나노입자의 제타전위가 각각 $-0.51 \pm 0.79 \text{mV}$ 과 $-9.71 \pm 1.52 \text{mV}$ 로 음의 값을 나타내는 반면, 키토산 코팅을 한 실시예 2-1 내지 2-3의 알벤다졸 나노입자는 각각 $+43.71 \pm 3.68 \text{mV}$, $+55.43 \pm 2.33 \text{mV}$, $+64.7 \pm 4.03 \text{mV}$ 로 양전하를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 이는 알벤다졸과 PLGA는 음전하를 띠지만, 키토산에 있는 아미노기(amino group)로부터의 protonation에 의해 양전하를 띠기 때문에 키토산이 코팅된 PLGA 나노입자가 양전하를 띠게 되는 것인데, 이처럼 키토산을 코팅하게 때문에, 음전하를 띠는 생체 내의 세포 표면에 본 발명의 알벤다졸 나노입자가 잘 부착할 수 있을 것으로 예상되었다.

[0057] 한편, 상기 나노입자의 제조 및 분석조건에 개시하지는 않았지만, PLGA를 사용하지 않고 키토산을 주요 고분자로 하여 알벤다졸 나노입자를 제조한 선행기술문헌(J Biomed Mater Res B Appl Biomater (2013) 101(6), 998-1005)을 참조하여, 아세트산에 알벤다졸을 녹여 에탄올 희석 후 나노입자를 제조하려고 하였지만, 알벤다졸의 용해가 잘 되지 않아 나노 입자가 잘 제조되지 않았다. 또한 아세트산만을 용매로 하여 약물을 녹여 나노입자를 만들었을 경우에도 약물의 분산도가 매우 좋지 않아, 나노입자의 안정성이 낮음을 알 수 있었다. PLGA 대신 키토산을 주요 고분자로 이용하여 나노입자를 만들었을 때는 나노입자가 제조되는 재현성이 현저하게 떨어져 상기 조건이 안정적인 나노입자를 제조하기에 적합하지 않음을 알 수 있었다.

[0058] <실험예 2. 알벤다졸 나노입자의 안정성 확인>

[0059] 나노입자의 안정성을 평가하기 위해 각 조건의 나노입자를 4℃에서 냉장보관하면서 1주 간격으로 4주 동안 입자 크기 변화를 관찰하여 하기 표 4에 나타내었다(알벤다졸을 포함하지 않은 나노입자인 비교예 1-11 내지 13의 값은 나타내지 않음).

표 4

조건	1주		2주		3주		4주	
	크기 (nm)	분산도	크기 (nm)	분산도	크기 (nm)	분산도	크기 (nm)	분산도
실시예 2-1	249.7±12.3	0.16	260.6±12.3	0.11	256.8±15.6	0.12	242.8±12.5	0.11
실시예 2-2	322.6±15.2	0.16	325.7±13.5	0.15	316.8±12.9	0.14	312.9±14.8	0.13
실시예 2-3	469.4±6.2	0.14	483.8±14.8	0.10	475.4±14.6	0.13	465.0±12.9	0.13
실시예 2-4	357.7±12.5	0.15	355.2±10.5	0.14	352.6±14.2	0.12	348.8±16.7	0.15
실시예 2-5	457.6±12.5	0.15	454.0±16.2	0.16	451.1±18.5	0.11	449.7±15.0	0.12
실시예 2-6	267.9±14.6	0.15	263.3±11.2	0.13	260.6±19.3	0.12	257.8±12.1	0.12
실시예 2-7	446.9±22.6	0.17	441.6±20.1	0.14	439.3±15.3	0.13	432.0±12.8	0.13
비교예 1-1	165.0±23.4	0.12	151.2±26.7	0.23	115.6±21.6	0.43	117.6±24.7	0.39
비교예 1-2	142.6±35.3	0.13	132.5±45.7	0.26	112.5±25.6	0.37	110.9±37.5	0.33
비교예 1-3	154.8±46.3	0.25	133.2±43.2	0.35	122.3±32.6	0.49	121.9±40.8	0.45
비교예 1-4	142.7±47.2	0.12	135.5±54.5	0.25	113.6±36.4	0.33	116.2±39.4	0.40
비교예 1-5	206.8±55.4	0.19	195.3±68.4	0.35	174.8±54.3	0.41	168.4±50.4	0.43
비교예 1-6	167.6±65.4	0.25	154.2±71.5	0.41	154.2±64.3	0.45	151.7±61.5	0.39
비교예 1-7	148.6±45.8	0.41	134.7±51.8	0.39	133.5±53.2	0.42	138.5±64.1	0.46
비교예 1-8	467.0±37.7	0.32	454.3±35.9	0.33	437.7±51.5	0.42	435.4±52.0	0.43
비교예 1-14	276.0±37.6	0.31	234.0±57.8	0.30	233.7±51.3	0.29	231±61.4	0.34
비교예 1-15	358.8±48.8	0.27	323.5±44.2	0.29	337.4±39.1	0.31	335.5±40.7	0.33
비교예 1-16	366.6±35.1	0.42	323.3±45.7	0.51	330.7±39.8	0.46	342.5±42.5	0.48
비교예 1-17	476.9±40.2	0.35	432.6±44.7	0.41	430.7±41.2	0.43	425.75±49.2	0.50

[0061] 상기 표 4를 참고하면, 입자크기를 1주일 간격으로 측정하여 안정성을 평가하였는데, 본 발명의 실시예 2의 알벤다졸 나노입자의 경우, 입자크기는 거의 변하지 않았으며 PDI값도 거의 일정하다. 따라서 나노입자는 4주간 안정한 것으로 확인된다. 이에 반해, 비교예 1의 나노입자는 시간의 흐름에 따라 나노입자가 깨지고 응집이 일

어나면서 나노입자의 크기와 PDI값의 분포가 크게 변하거나 측정할 수 없는 상태로 변화하는 것으로 확인된다.

[0062] 한편, 상기 실험에 1 및 실험에 2의 결과를 참고로 하여, 이후의 실험은 알벤다졸 나노입자가 잘 제조되었음을 확인하기 위해, 주로 실시예 2-1 내지 2-3의 알벤다졸 나노입자와 비교예 1-1 내지 1-6의 알벤다졸 나노입자 중에서 선택하여 확인하였다.

[0063] <실험에 3. 알벤다졸 나노입자의 표면 특성>

[0064] 주사전자현미경(FE-SEM, field emission scanning electron microscope)으로 알벤다졸 약물과 본 발명의 실시예 2-3의 각 나노입자의 형태를 관찰하였다. 각 시료는 양면 카본 테이프에 떨어뜨리고, 금과 팔라듐 혼합물로 50초간 나노입자를 코팅한 후 주사전자현미경(JEOL JSM7500, Thermo, USA)으로 나노입자를 관찰하였다.

[0065] 도 3을 참고하면, 알벤다졸 약물 자체는 불규칙한 평판 모양을 나타내었으나, 본 발명의 실시예 2-3의 PLGA, 폴록사머 188, 알벤다졸을 포함하고, 이를 키토산으로 코팅한 나노입자는 입자 크기가 200~300nm인 매끈한 구 모양을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 이렇게 구 모양을 이루는 나노입자는 알벤다졸 약물 자체보다 비표면적이 크기 때문에 나노입자에 봉입된 알벤다졸의 용해도가 나노입자화 되지 않은 약물에 비해 더 커진다. 게다가, 이와 같은 나노입자의 매끈한 표면은 나노입자화 되지 않은 결정이나 불규칙한 입자에 비해 조직 자극도 감소시킬 수 있다고 알려져 있어(Malhotra and Majumdar, J. Exp. Biol., 39, pp11-24, 2001), 본 발명의 알벤다졸 나노입자가 생체이용성이 높은 약물로 사용될 수 있음을 알 수 있다. 한편, 키토산이 코팅되지 않은 알벤다졸 나노입자의 경우, 표면에 거칠고 불규칙적인 요철이 많은 것으로 확인된다(데이터 미첨부).

[0066] <실험에 4. 알벤다졸 나노입자의 FT-IR 확인>

[0067] 알벤다졸, 키토산, PLGA, 폴록사머 188, 이들의 혼합물과 이 조성으로 제조한 나노입자의 FT-IR(Fourier-transform infrared spectroscopy)(thermo nicolet 380 ftir spectrometer)을 측정하였다. 키토산의 조성비를 변화시키면서 나노입자를 제조한 후 나노입자의 FT-IR을 측정하였고 파장 범위는 4000에서 500cm⁻¹으로 설정하였다. KBr에 시료를 분산시킨 후 압력을 가하여 disc를 제조한 후, 광로에 맞추어 위치시킨 후 도 4와 같은 스펙트럼을 얻었다.

[0068] 이 분석을 위해 알벤다졸, PLGA, 폴록사머, 키토산을 각 10mg씩 사용하였다. 또한, 혼합물의 경우 PLGA 100mg, 폴록사머 200mg, 키토산 200mg, 및 알벤다졸 20mg을 혼합하여 10mg을 샘플링하여 FT-IR을 측정하였고, 각 나노입자도 10mg씩 사용하여 FT-IR을 측정하였다.

[0069] 도 4를 참고하면, 알벤다졸의 FT-IR 스펙트럼은 3324cm⁻¹에서 N-H stretching vibration을, 1653cm⁻¹에서 bending vibration을 나타낸다(Castro et al., Pharm. Dev. Technol., 18, pp434-442, 2013).

[0070] PLGA의 FT-IR 스펙트럼은 1758cm⁻¹에서 carbonyl C=O stretch를, 1091~1172cm⁻¹에서 C-O stretch를 나타낸다(Yang et al., Int. J. Pharm., 331, pp123-132, 2007).

[0071] 키토산의 FT-IR 스펙트럼은 3363cm⁻¹에서 O-H과 N-H stretch를, 2874cm⁻¹에서 C-H stretch를, 1653cm⁻¹에서 N-H band를, 1070cm⁻¹에서 C-O-C stretch를 나타낸다(Gregorio-Jauregui et al., J. Nanomater., 2012, pp1-8, 2012).

[0072] 폴록사머 188의 FT-IR 스펙트럼은 2883cm⁻¹에서 C-H stretch를, 1341cm⁻¹에서 O-H band를, 1099cm⁻¹에서 C-O stretch를 나타낸다(Sharma et al., J. Chil. Chem. Soc., 53, 2013).

[0073] 알벤다졸, PLGA, 키토산 및 폴록사머 188의 혼합물의 FT-IR 스펙트럼은 알벤다졸의 조성비가 비교적 낮기 때문에 약한 피크를 나타낸다(알벤다졸이 다른 부형제에 비해 상대적으로 적게 들어감에 따라 다른 부형제에 피크가 가려져서 다른 부형제에 비해 상대적으로 약하게 피크가 나타남).

[0074] 한편, 키토산 코팅이 되지 않은 비교예 1-3의 알벤다졸 나노입자의 FT-IR 스펙트럼은 PLGA의 피크를 보이는데, 본 발명의 실시예 2-1 내지 2-3의 키토산이 코팅된 알벤다졸 나노입자의 FT-IR 스펙트럼에서는 PLGA의 피크가 사라지는 것으로 확인된다. 즉, 키토산의 조성비가 증가할수록 음전하를 나타내는 PLGA에 키토산이 흡착되어 양전하가 증가하여 PLGA의 피크가 사라진 것으로 판단된다.

[0075] <실험에 5. 알벤다졸 나노입자의 시차주사열량계 (Differential scanning calorimetry (DSC))>

- [0076] 알벤다졸, 키토산, PLGA, 폴록사머 188, 이들의 혼합물과 이 조성으로 제조한 나노입자의 열변화를 측정하였다 (분석장비:S-650, SCINCO, Korea). 각 시료 2mg을 알루미늄 팬에 놓고, 0-250℃의 온도범위에서 분당 10℃씩 온도를 상승시키면서 시료의 열적 변화를 관찰하였고 이를 도 5에 나타내었다.
- [0077] 도 5를 참고하면, 알벤다졸, PLGA, 키토산, 폴록사머 188, 이들의 혼합물, 비교예 1-3의 알벤다졸 나노입자 및 실시예 1-3의 알벤다졸 나노입자의 시차주사열량계 측정결과, 알벤다졸은 208.59℃에서 흡열 피크를 나타내는데, 이는 융점인 것으로 판단된다(Daniel-Mwambete et al., Int. J. Pharm., 272, pp29-36, 2004).
- [0078] PLGA, 키토산, 폴록사머 188은 각각 48.66℃, 102.32℃, 53.68℃에서 상전이온도(Tg)를 나타낸다.
- [0079] 비교예 1-3의 알벤다졸 나노입자는 피크를 나타내지 않았기 때문에 알벤다졸이 나노제형 내에서 잘 봉입되었을 것으로 판단되며, 실시예 2-3의 알벤다졸 나노입자는 키토산의 상전이온도와 비슷한 101.68℃에서 피크를 나타내어, 상기 실시예 2-3의 알벤다졸 나노입자의 표면에 키토산이 잘 코팅되었음을 확인할 수 있다.
- [0080] <실험예 6. 알벤다졸 나노입자의 X선 회절 확인>
- [0081] 알벤다졸, 키토산, PLGA, 비교예 1-3의 알벤다졸 나노입자 및 실시예 2-3의 알벤다졸 나노입자의 X선 회절(X-ray powder diffraction, XRD)(D8 DISCOVER, Bruker AXS, Germany)을 측정하여 이 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0082] 도 6을 참고하면, 알벤다졸과 PLGA는 결정성을 나타내었으나 나노입자로 제조된 후에는 결정성을 나타내지 않아 무정형으로 바뀌었음을 알 수 있으며, 키토산을 코팅했을 때도 이 형태가 잘 유지됨을 알 수 있다. 또한, 일반적으로 키토산은 무정형 물질로 알려져 있기에(Makadia and Siegel, Polymers, 3, pp1377-1397, 2011; Okano et al., Polymer Bull., 62, pp119-126, 2009), 본 발명의 알벤다졸 나노입자가 키토산이 잘 코팅된 것임을 알 수 있다.
- [0083] <실험예 7. 알벤다졸 나노입자의 방출 확인>
- [0084] 알벤다졸의 *in vitro* 방출시험은 투석법으로 수행하였다. 각 시료를 1ml 인산완충액에 분산시켜 투석백에 넣고 10ml 인산완충액에 담근 후, 교반하면서 일정시간 마다 상층액을 취해 알벤다졸의 농도를 측정하였으며, 이에 대한 결과는 도 7 및 8에 나타내었다.
- [0085] 키토산 코팅을 하기 전의 폴록사머의 조성에 따라 방출 정도를 비교한 결과를 먼저 확인하면(도 7), pH 7.4의 체내 조건에서, 폴록사머 188이 포함된 비교예 1-1 내지 1-3의 나노입자의 알벤다졸 방출이 알벤다졸 약물 자체나 폴록사머 407이 포함된 비교예 1-4 내지 1-6의 나노입자에 비해 빠른 것을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 알벤다졸 나노입자의 제조를 위해 폴록사머 407보다 폴록사머 188을 사용하는 것이 바람직함을 다시 한번 확인할 수 있다.
- [0086] 이에, 키토산 코팅 여부에 따른 방출조건은 폴록사머 188이 포함된 것을 기준으로 비교하였는데, 도 8을 참고하면, pH 7.4의 체내 조건에서, 알벤다졸 약물 자체나 비교예 1-3의 나노입자에 비해 실시예 2-1 내지 2-3의 나노입자의 알벤다졸 방출조건이 현저하게 좋음을 알 수 있다. 이에, 키토산 코팅을 한 나노입자의 제조를 통해 알벤다졸의 체내 이용이 더 높아졌음을 확인할 수 있다.
- [0087] <실험예 8. 알벤다졸 나노입자의 점막점착성 확인>
- [0088] 알벤다졸 나노입자의 점막점착성은 간단하게 뮤신입자법 및 제타전위의 측정으로 확인하였다. 동일한 양의 나노입자 현탁액과 1%(w/v) 뮤신 수용액을 실온에서 혼합하고 하루 방치한 후, 제타전위의 변화를 측정하였다. 소장 표면의 뮤신은 음하전을 띠는 시알릭산(sialic acid)을 갖고 있어서, 양전하는 띠는 나노입자는 소장 표면의 뮤신에 정전기적으로 점착될 수 있으며 그 결과 생체이용률이 증가할 수 있다.
- [0089] 상기 실험결과는 표 5에 나타내었는데, 하기 표 5의 결과를 참고하면, 뮤신입자의 제타전위는 $-5.51 \pm 0.18\text{mV}$ 였으나, 실시예 2-1 내지 2-3의 나노입자의 제타전위는 각각 $-5.66 \pm 0.15\text{mV}$, $-4.99 \pm 0.46\text{mV}$ 및 $-4.21 \pm 0.42\text{mV}$ 로 확인된다.

표 5

조건	Zeta potential (mV)
뮤신	-5.51 ± 0.18
실시예 2-1	-5.66 ± 0.15
실시예 2-2	-4.99 ± 0.46

실시예 2-3	-4.21 ± 0.42
---------	--------------

[0091] 즉, 키토산이 코팅된 나노입자가 뮤신에 결합하여 음전하의 뮤신의 제타전위가 변화되었음을 알 수 있는데, 실시예 2-3의 나노입자에 코팅된 키토산의 양이 가장 많았기 때문에 뮤신입자에 대한 점착성이 커져 제타전위 값이 가장 많이 변한 것으로 판단된다(Takeuchi et al., Adv, Drug Deliv. Rev., 57, pp1583-1594, 2005). 한편, 상기 결과를 통해, 키토산이 코팅되지 않은 나노입자들은 처음부터 강한 음전하를 띄기 때문에, 뮤신과의 점착성이 낮으며, 이로 인한 약물 치료 효과도 낮을 것으로 예상된다.

[0092] <실험예 9. 알벤다졸 나노입자의 항암 효과 확인>

[0093] Caco-2 세포를 96-웰 플레이트(96-well plate)에서 1×10^4 세포/웰로 분주한 후 12시간이 지난 다음 알벤다졸과 각 조건의 나노입자($100 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 의 현탁액)를 24시간 동안 처리하였다. 이 후, 배지를 제거하고 $100 \mu\text{l}$ 의 1 mg/ml MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약을 4시간 동안 가해진 다음 형성된 포마잔(formazan) 결정이 떨어져오지 않도록 MTT 액상을 조심스럽게 제거한 다음 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 가하여 포마잔 결정을 용해시켰다. 실온에서 30분간 방치 후, 565nm에서 흡광도를 측정하고 처리하지 않은 대조세포를 기준으로 세포 생존율을 하기 표 6에 산출하였다.

표 6

[0094]

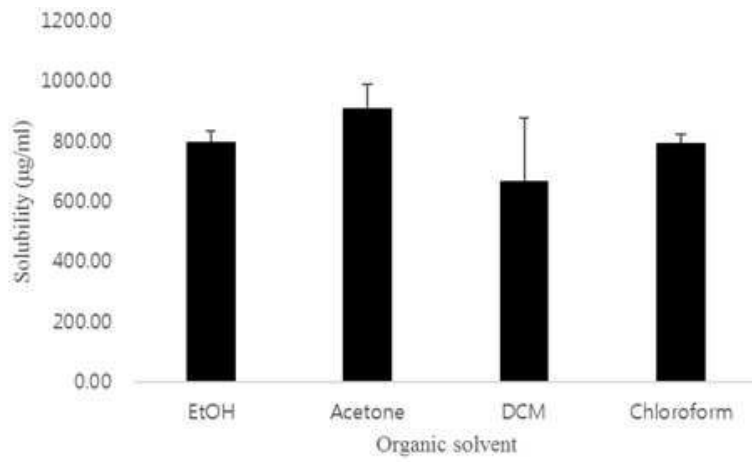
조건	Caco-2 세포주의 생존율(%)
알벤다졸	85.5±1.0
실시예 2-1	35.4±4.1
실시예 2-2	32.5±5.2
실시예 2-3	24.3±6.5
실시예 2-4	34.2±3.6
실시예 2-5	37.7±6.9
실시예 2-6	38.2±5.2
실시예 2-7	21.2±7.3
비교예 1-1	72.3±3.6
비교예 1-2	70.6±7.3
비교예 1-3	74.3±1.6
비교예 1-4	77.9±5.9
비교예 1-5	78.4±3.6
비교예 1-6	79.4±6.7
비교예 1-7	69.5±4.4
비교예 1-8	72.9±6.5
비교예 1-11	87.3±3.2
비교예 1-12	84.4±6.0
비교예 1-13	84.9±5.5
비교예 1-14	69.8±7.0
비교예 1-15	71.6±6.7
비교예 1-16	75.7±7.8
비교예 1-17	67.8±2.5

[0095] 상기 표 7을 참고하면, 알벤다졸과 나노입자의 세포독성 시험결과, Caco-2 세포주의 생존율(%)은 실시예 2의 PLGA, 폴록사머, 알벤다졸로 나노입자를 제조한 후 이를 키토산으로 코팅한 것의 세포독성이 가장 높음을 알 수 있다. 한편, PLGA, 알벤다졸, 키토산, 폴록사머 188의 함량이 너무 많거나 적어도, 폴록사머 407을 이용하는 경우에도, 세포독성이 낮았다.

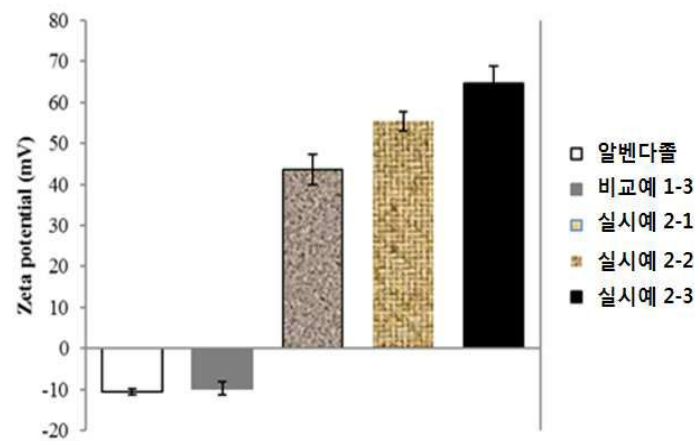
[0096] 이에, 상기 결과로부터 본 발명의 방법으로 키토산이 코팅된 알벤다졸 나노입자의 이용으로, 난용성의 알벤다졸의 경구 생체이용률과 항암효과가 증가되어 탁월한 항암제로 사용될 수 있음을 확인할 수 있다.

도면

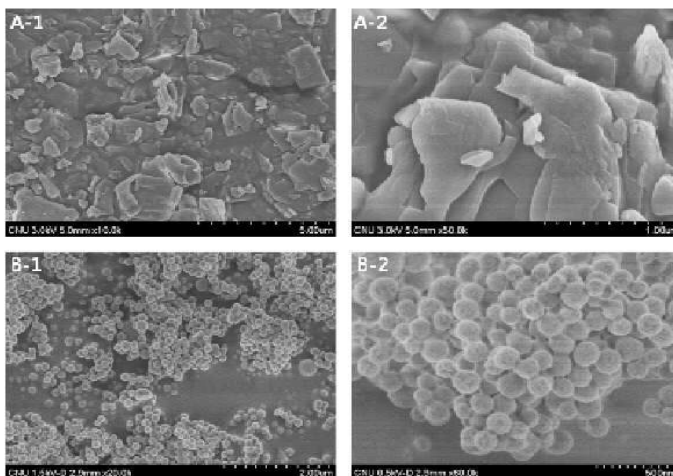
도면1



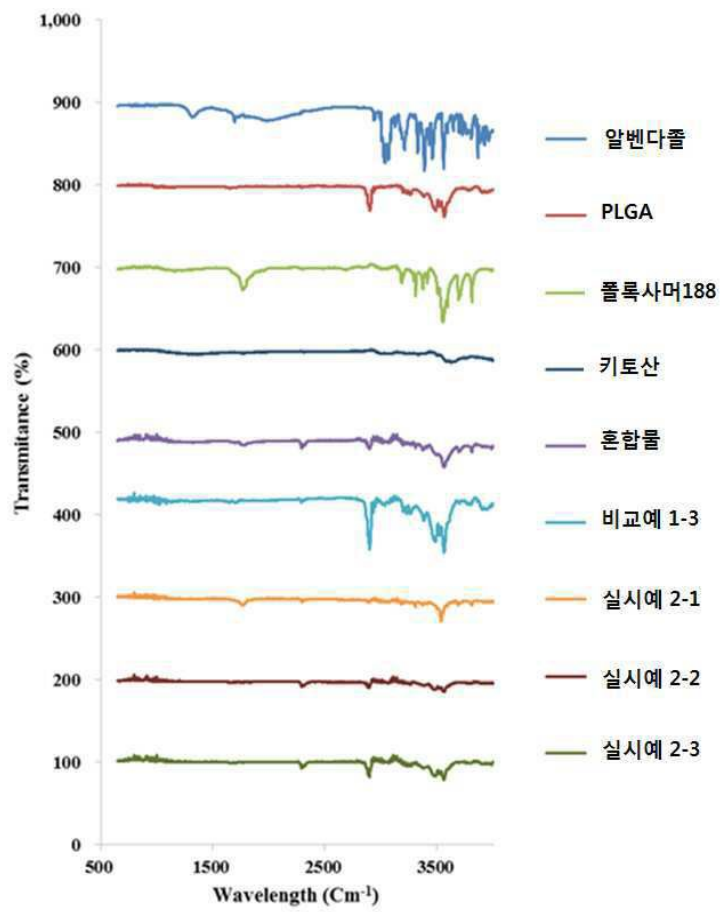
도면2



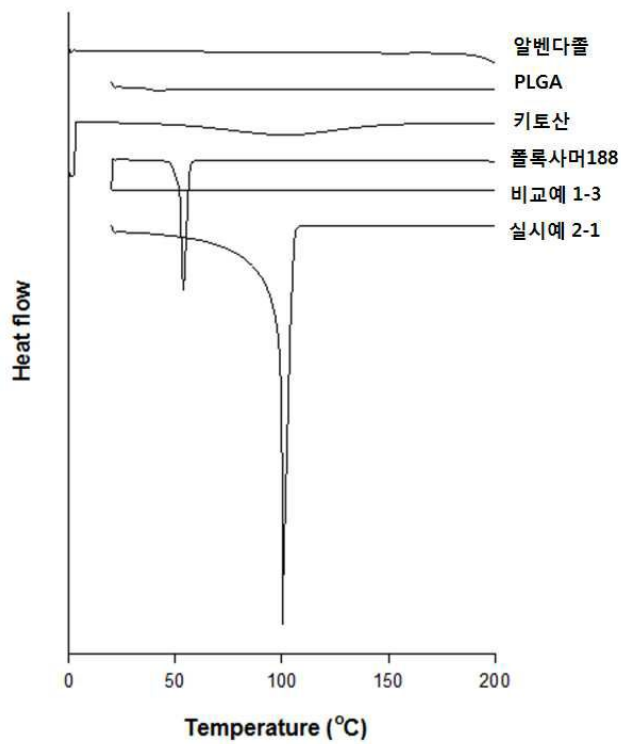
도면3



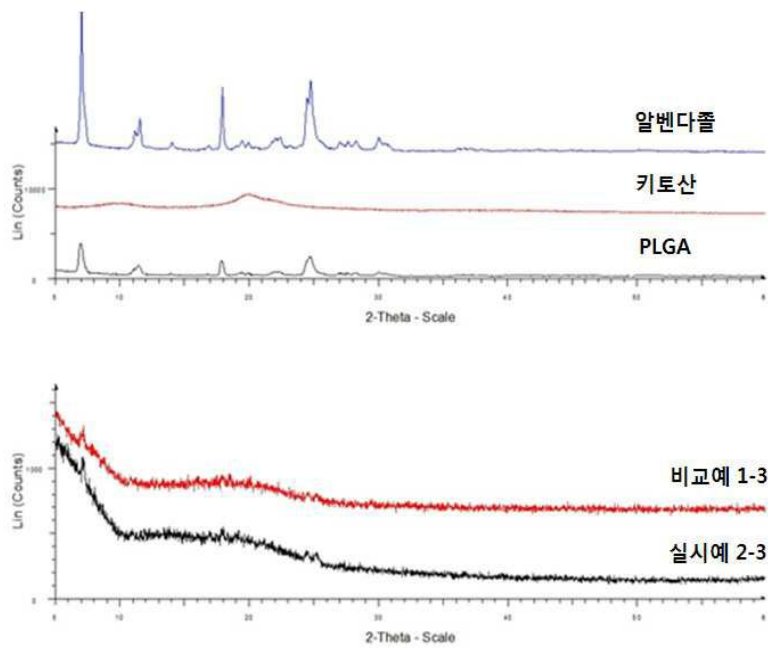
도면4



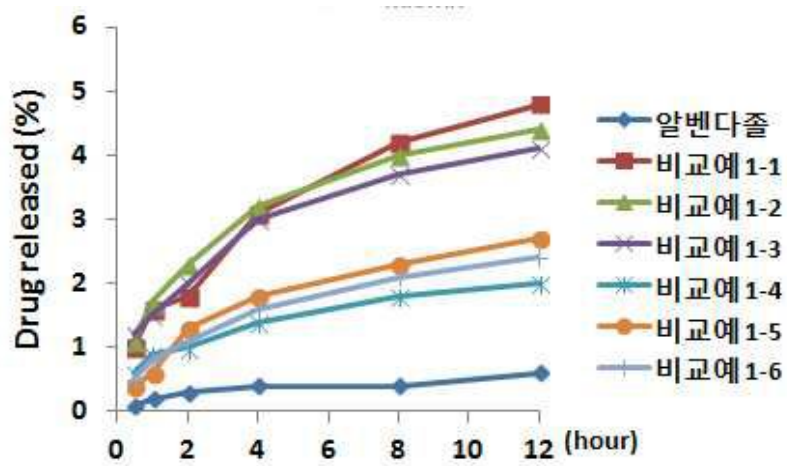
도면5



도면6



도면7



도면8

